

医药与日化原料

## 溶剂法制备降血糖肽固体分散体及其稳定性

陈百科<sup>1</sup>, 李慧<sup>1</sup>, 金素莱曼<sup>1</sup>, 包海蓉<sup>1,2,3\*</sup>

[1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306]

**摘要:** 以降血糖肽为模型, 尤特奇 L-100 (EL-100) 为载体, 羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 为释放调节剂, 采用溶剂法制备了降血糖肽固体分散体, 并对其稳定性和体外释放进行了研究。以降血糖肽固体分散体 2 h 的累积释放率和二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 抑制率为评价指标, 对肠溶载体和释放调节剂配比进行了优化, 利用 SEM、FTIR 和 TEM 对降血糖肽固体分散体进行了表征, 并考察了降血糖肽固体分散体不同储存时间和储存温度下的稳定性。结果表明, 在  $m(\text{降血糖肽}) : m(\text{EL-100}) : m(\text{HPMC}) = 1 : 2 : 0.2$  条件下制备的降血糖肽固体分散体 2 h 的累积释放率达到 93.54%, 且 DPP-IV 抑制率具有较高水平。SEM 和 TEM 分析表明, 降血糖肽分散在固体分散体中; FTIR 表明, 降血糖肽二级结构的构象发生了变化。降血糖肽固体分散体能显著增强降血糖肽的稳定性, 常温 (25 °C) 储存 10 d 后累积释放率仍高达 90.32%, 在高温环境下也表现出较强的稳定性。

**关键词:** 降血糖肽; 固体分散技术; 累积释放率; 稳定性; DPP-IV 抑制率; 医药原料

中图分类号: TS218 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2022) 05-0956-07

## Preparation and stability of hypoglycemic peptide solid dispersion by solvent method

CHEN Baike<sup>1</sup>, LI Hui<sup>1</sup>, JIN Sulaiman<sup>1</sup>, BAO Hairong<sup>1,2,3\*</sup>

[1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Processing and Preservation, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China]

**Abstract:** Hypoglycemic peptide solid dispersion was prepared by solvent method using hypoglycemic peptide as model, Eudragit L-100 (EL-100) as carrier, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) as release regulator. The stability and *in-vitro* release of hypoglycemic peptide solid dispersion were studied. The 2 h cumulative release rate of solid dispersion and the inhibition rate of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) were used as evaluation indexes. The ratio of enteric carrier to release regulator was optimized. The solid dispersion was characterized by SEM, FTIR and TEM, and its stability at different storage times and temperatures was investigated. The results showed that  $m(\text{hypoglycemic peptide}) : m(\text{EL-100}) : m(\text{HPMC}) = 1 : 2 : 0.2$  was the optimum mass ratio of hypoglycemic peptide solid dispersion. The 2 h cumulative release rate of the solid dispersion prepared under this condition reached 93.54%, and the inhibition rate of DPP-IV reached high level. SEM and TEM results indicated that the bioactive peptide was dispersed in the solid dispersion. FTIR spectrum showed that the conformation of the secondary structure of the bioactive peptide changed. The solid dispersion could significantly enhance the stability of hypoglycemic peptide, and the cumulative release rate was still as high as 90.32% after 10 d of storage at room temperature, it also exhibited strong stability in high temperature environment.

**Key words:** hypoglycemic peptide; solid dispersion technology; cumulative release rate; stability; DPP-IV inhibition rate; drug materials

收稿日期: 2021-12-28; 定用日期: 2022-02-08; DOI: 10.13550/j.jxhg.20211327

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFD0902000)

作者简介: 陈百科 (1996—), 男, 硕士生, E-mail: 15869106150@163.com。联系人: 包海蓉 (1969—), 女, 副教授, E-mail: hrbao@shou.edu.cn。

生物活性肽根据自身不同的序列,可以表现出抗血栓、抗高血压、抗菌、抗糖尿病、抗氧化和免疫调节等功能<sup>[1]</sup>,甚至可以通过作为辅助性佐剂的形式用于治疗/预防新型冠状病毒<sup>[2]</sup>。现代营养学研究发现,膳食中的蛋白质经消化酶作用后,大多是以低聚肽的形式被人体所吸收和利用,以游离氨基酸的形式被吸收的比例并不高,且肽比游离氨基酸更容易被吸收,这表明肽的生物效价和营养价值都高于游离氨基酸<sup>[3]</sup>。因此,生物活性肽被认为是新一代生物活性调节剂,可用于改善各种疾病的预防与治疗,从而提高人们的生活质量。

NONGONIERMA 等<sup>[4]</sup>总结了从奶(牛、骆驼和马)、猪、鱼、小麦和大型藻类(棕榈藻)等食物蛋白来源中提取的肽,其中 50 种对二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值小于 100  $\mu\text{mol/L}$ , 其长度均在 2~17 个氨基酸残基之间。POWERB 等<sup>[5]</sup>发现,乳清蛋白水解物可以抑制 DPP-IV 活性。UENISHI 等<sup>[6]</sup>从豪达奶酪的水溶性提取物中分离并最终合成对 DPP-IV 有抑制作用的肽 LPQNIPPL, 之后的小鼠动物实验进一步验证了该肽的效果。但是活性肽不稳定,易受环境影响而变质,口服则易受消化道逆环境影响,被体内的蛋白酶分解而失去原有的功能性,因此,如何提高活性肽的稳定性及其生物利用率成为当前亟待解决的问题。在食品、药品研究领域,常通过固体分散体、微胶囊、脂质体、纳米颗粒和乳液体系等方式来改善功能活性物质的水溶性,提高其稳定性,控制递送、释放,进而提高其生物利用度<sup>[7]</sup>。CHRISTOPHERSEN 等<sup>[8]</sup>研究了含有不同类型脂质辅料的固体脂质颗粒在生物活性肽释放后的降解机制,结果表明,溶菌酶在水溶液中加入固体脂质颗粒比在固体中释放溶菌酶的速度要快得多。然而,固体脂质颗粒的疏水性限制了其对亲水性多肽的封装性。KARAMANIDOU 等<sup>[9]</sup>开发了一种新的黏液渗透纳米乳化给药系统配方,加入了胰岛素/二肉豆蔻基磷脂酰甘油的疏水离子对,黏液的渗透性增强。但目前鲜见通过固体分散技术提高活性肽稳定性和累积释放率的报道。

本研究以降血糖肽为模型,以尤特奇 L-100 (EL-100) 为载体,羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 为释放调节剂,运用固体分散技术在维持活性的前提下,提高降血糖肽的累积释放率和稳定性,为活性肽的综合利用提供新的思路,以期为基于活性肽的功能性食品开发提供一定的参考。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

降血糖肽(由脱脂南极磷虾粉酶解获得,相对

分子质量<3000),上海海洋大学食品学院;EL-100 (批号:C11679354)、HPMC(4000 mPa·s,批号:C11679354),化学纯,上海麦克林生化科技有限公司;DPP-IV抑制率试剂盒,北京博奥派克生物科技有限公司;三氯乙酸(TCA)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、酒石酸钾钠、NaOH、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , AR,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;HCl, GR,南京化学试剂股份有限公司;无水乙醇, AR,国药集团化学试剂有限公司。

RCZ-1B 型溶出试验箱,上海黄海药检仪器有限公司;T6 新世纪紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;SU5000 热场发射扫描电子显微镜,日本日立公司;真空冷冻干燥机,世友创业(北京)科技有限公司;傅里叶变换红外光谱仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Talo L120C G2 型透射电子显微镜,美国 FEI 公司;FlexStation3 多功能微孔读板机(酶标仪),Molecular Devices 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标准曲线的确定

参考文献[10]方法略作修改,用质量分数 5% 的三氯乙酸(TCA)溶液分别配制质量浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L 的降血糖肽标准溶液,然后各取 6.0 mL 标准溶液,加入 4.0 mL 双缩脲试剂(由  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、酒石酸钾钠、NaOH 配制),于漩涡混合仪上混合均匀,静置 30 min, 5000 r/min 离心 10 min,取上清液于 540 nm 下测定吸光度值(OD),并进行精密度和重复性实验。以吸光度为纵坐标,降血糖肽标准溶液质量浓度为横坐标进行回归分析,得到方程  $y = 0.056x - 0.0017$ ,  $R^2 = 0.999$ ,精密度的 1.56%,重现性为 0.61% ( $n=3$ )。

#### 1.2.2 降血糖肽固体分散体的制备

取一定量降血糖肽,加入到已经溶胀好的 EL-100 水溶液 [ $m(\text{EL-100}) : m(\text{水}) = 1 : 2$ ] 中,再加入适量 HPMC,剧烈搅拌,并超声 15 min 使降血糖肽与载体在溶剂中充分混合并分散,然后在真空冷冻干燥机中冻干 48 h,得到降血糖肽固体分散体,研磨过 200 目筛后在密闭、干燥条件下储存。

#### 1.2.3 载药率测定

称取 100 mg 降血糖肽固体分散体,加入适量无水乙醇,研磨使其完全破壁溶解。再加入少许水,使降血糖肽充分溶解,反复洗涤后,收集洗涤液过滤,采用 1.2.1 节方法测定吸光度并计算降血糖肽质量浓度,按式(1)计算载药率。

$$\text{载药率} / \% = \frac{m_A}{m_B} \times 100 \quad (1)$$

式中: $m_A$  为降血糖肽固体分散体中降血糖肽的质量,mg; $m_B$  为加入降血糖肽的总质量,mg。

### 1.2.4 体外释放对比实验

分别称取 200 mg 降血糖肽和降血糖肽固体分散体 (相当于降血糖肽 200 mg), 置于溶出试验箱中, 转速为 75 r/min, 温度为 37 °C, 先在 0.1 mol/L 盐酸溶液反应 2 h, 再以 0.2 mol/L 磷酸钠溶液调节溶液 pH 至 6.8, 继续实验, 每隔一定时间后取出溶液 2 mL 并及时补充等量释放介质。所取样液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 采用 1.2.1 节方法测定吸光度并计算降血糖肽质量浓度, 同时按式 (2) 计算累积释放率。

$$\text{累积释放率}/\% = \frac{\rho_n V_0 + V_i \sum_{i=1}^{n-1} \rho_i}{m} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $\rho_n$  为第  $n$  次取样后释放介质中降血糖肽的质量浓度, g/L;  $V_0$  为释放介质的体积, L;  $V_i$  为每次取样的体积, L;  $\rho_i$  为第  $i$  次取样后取样前释放介质中降血糖肽的质量浓度, g/L;  $m$  为降血糖肽投料量, g。

### 1.2.5 降血糖肽固体分散体的表征

SEM 测试: 分别取适量的降血糖肽、EL-100、HPMC、降血糖肽固体分散体和物理混合物, 喷金处理后通过 SEM 观察表观形貌。FTIR 测试: 采用溴化钾压片法对降血糖肽、EL-100、HPMC、降血糖肽固体分散体和物理混合物进行 FTIR 测试, 波数范围 4000~400  $\text{cm}^{-1}$ 。TEM 测试: 取适量降血糖肽、降血糖肽固体分散体和物理混合物用纯水溶解, 磷钨酸法染色后, 用 TEM 进行观察。

### 1.2.6 DPP-IV 抑制率的测定

采用荧光光谱法测定 DPP-IV 抑制率。依次将 50 μL DPP-IV 酶 (49 μL 缓冲液和 1 μL 酶)、磷酸盐缓冲液 (pH=6.8) 配制的 10 μL 抑制剂 (样品) 加入酶标板混匀, 加入 25 μL 底物启动反应。37 °C 下孵育 15 min, 在酶标仪上检测得到样品的荧光度值。按式 (3) 计算得出对 DPP-IV 的抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{F_{\text{对照}} - F_{\text{样品}} - F_{\text{空白}}}{F_{\text{对照}}} \times 100 \quad (3)$$

式中:  $F_{\text{样品}}$  为样品的荧光度值;  $F_{\text{空白}}$  为 50 μL 缓冲液代替 50 μL DPP-IV 酶测得的荧光度值;  $F_{\text{对照}}$  为 10 μL 缓冲液代替 10 μL 抑制剂 (样品) 测得的荧光度值。

### 1.2.7 降血糖肽固体分散体的稳定性测定

#### 1.2.7.1 储存时间对降血糖肽固体分散体稳定性的影响

将 200 mg 降血糖肽固体分散体置于 10 mL 称量瓶中, 置于温度 20 °C, 湿度 60% 条件下开口放置 10 d, 分别于第 0 d、第 5 d 和第 10 d 取样, 采用 1.2.1 节方法测定吸光度并计算降血糖肽质量浓度, 同时通过公式 (2) 计算累积释放率。同时, 将未制成固

体分散体的降血糖肽的稳定性用作比较研究。

#### 1.2.7.2 储存温度对降血糖肽固体分散体稳定性的影响

将 200 mg 降血糖肽固体分散体置于 10 mL 称量瓶中, 分别开口置于 60、40、25 °C 下放置 10 d, 于第 0 d、第 5 d 和第 10 d 取样, 采用 1.2.1 节方法测定吸光度并计算降血糖肽质量浓度, 同时通过公式 (2) 计算累积释放率。

### 1.3 数据处理与分析

所有数据均采用 Origin 2018 进行数据分析与作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 降血糖肽固体分散体制备工艺优化

调节配方中不同物质的比例, 可以获得具有较高累积释放率的工艺参数, 结果见表 1。其提高累积释放率的原理是 EL-100 的活性基团为 -COOH, 在较低的 pH 下较为稳定, 而在较高的 pH 环境中与 OH<sup>-</sup> 结合成盐, 由于 COO<sup>-</sup> 的相互排斥作用, 使分子间空隙变大, 结构疏松, 功能原料得以释放<sup>[11]</sup>。

表 1 不同配方条件下降血糖肽固体分散体的累积释放率  
Table 1 Cumulative release rate of hypoglycemic peptide of different formulations

编号	配方中固形物质量/mg			累积释放率 <sup>①</sup> /%
	EL-100	降血糖肽	HPMC	
1	200	100	20	93.54
2	400	100	20	73.77
3	600	100	20	70.97
4	200	200	20	86.45
5	400	200	20	89.04
6	600	200	20	87.97
7	200	300	20	84.04
8	400	300	20	88.06
9	600	300	20	88.75

① 2 h 时的累积释放率。

如表 1 所示, 固定释放调节剂 HPMC 用量, 当载体 EL-100 与降血糖肽的质量比接近 2:1 时, 降血糖肽固体分散体中降血糖肽的累积释放率较大; 当两者质量比大于 2:1 时, 累积释放率降低。可能最开始随着 EL-100 用量的逐渐增加, 载体能完全包埋降血糖肽, 释放效果较好, 但是随着载体用量的进一步增大, 降血糖肽被过度包埋, 形成的膜分子流动能力太差, 导致累积释放率下降。降血糖肽固体分散体的制备配方为 200 mg EL-100、100 mg 降血糖肽和 20 mg HPMC [即  $m(\text{降血糖肽}) : m(\text{EL-100}) : m(\text{HPMC}) = 1 : 2 : 0.2$ ] 时, 降血糖肽固体分散体的累积释放率达到最高, 为 93.54%。因此, 采用该配方制备的固体分散体进行后续实验; 并且按此配方

比例得到相应物理混合物。降血糖肽固体分散体在乙醇中破壁溶解后测得载药率为 90.14%。可能是 EL-100 有很好的成膜性, 随着水分蒸发, 表面张力增大, 使胶体颗粒间紧密聚集, 聚合物链之间也开始相互接触、交错, 形成表面光滑、分子流动能力与表面透膜能力较低的薄膜, 将降血糖肽包裹起来, 而 HPMC 的添加填补了在包衣结束后聚合物链之间依旧存在的一些孔道, 提高了膜的稳定性<sup>[12]</sup>。

## 2.2 降血糖肽固体分散体外释放比较

对于理想的肠溶型功能食品或药物输送体系, 应尽可能在胃部强酸性环境下保持体系相对稳定, 而在进入肠道环境后能尽快充分释放出功能原料, 以达到提高功能原料在肠道内吸收的目的<sup>[13]</sup>。按照 1.2.4 节方法测定了降血糖肽固体分散体和降血糖肽在 pH 1.0 和 pH 6.8 的释放介质中的释放效果, 结果如图 1 所示。降血糖肽固体分散体在 pH 1.0 的释放介质中 2 h 累积释放率为 9.21%, 符合中国药典四部通则 0931 在酸中释放率小于 10% 的规定; 在 pH 6.8 的释放介质中 2 h 累积释放率为 92.09%, 且符合通则 0931 在缓冲液中 45 min 累积释放率大于 70% 的规定<sup>[14]</sup>。

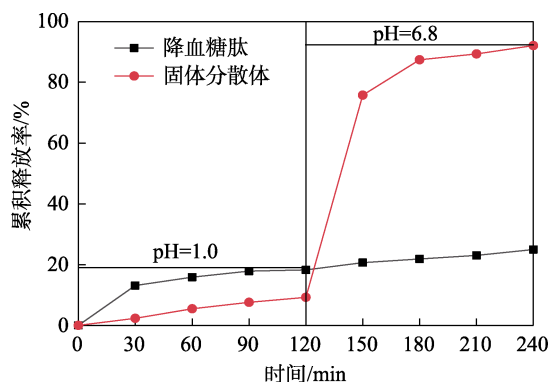


图 1 pH 1.0、pH 6.8 条件下降血糖肽和降血糖肽固体分散体的累积释放率

Fig. 1 Cumulative release of hypoglycemic peptide and solid dispersion at pH 1.0 and pH 6.8

## 2.3 降血糖肽固体分散体的 SEM 分析

图 2 为降血糖肽、EL-100、HPMC 和降血糖肽固体分散体的 SEM 图。

由图 2 可以看出, 降血糖肽原料表面有不规则凹陷和凸起; EL-100 多呈大小不一、表面光滑且有凹陷的球状; HPMC 多呈麻花杆状, 部分结构两端中心有凹陷; 降血糖肽固体分散体的表现形态与前三者完全不同, 降血糖肽、载体及调节剂本身的特征消失, 表现为许多小球状结构紧密结合的状态。

## 2.4 降血糖肽固体分散体的红外光谱表征

图 3 为降血糖肽、EL-100、HPMC、物理混合物和降血糖肽固体分散体的红外光谱图。

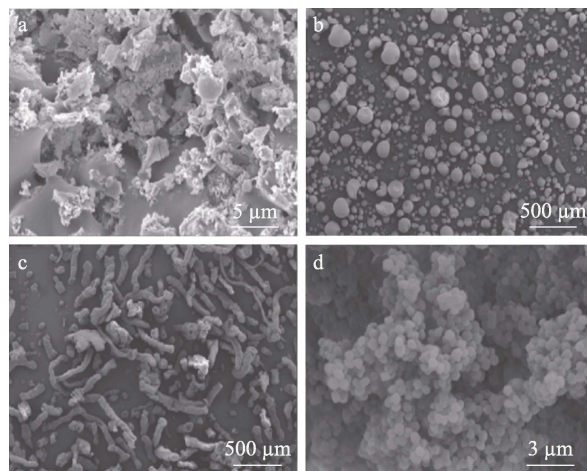


图 2 降血糖肽 (a)、EL-100 (b)、HPMC (c)、降血糖肽固体分散体 (d) 的 SEM 图

Fig. 2 SEM images of hypoglycemic peptide (a), EL-100 (b), HPMC (c) and solid dispersion (d)

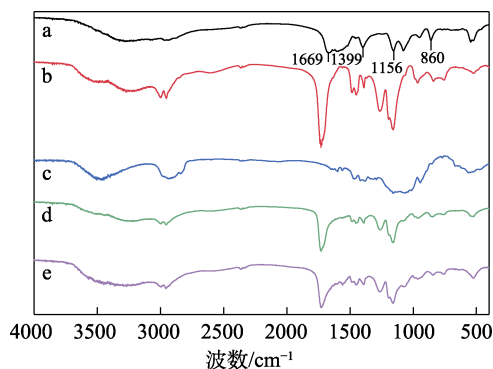


图 3 降血糖肽 (a)、EL-100 (b)、HPMC (c)、原料物理混合物 (d)、降血糖肽固体分散体 (e) 的 FTIR 谱图

Fig. 3 FTIR spectra of hypoglycemic peptide (a), EL-100 (b), HPMC (c), physical mixture (d) and solid dispersion (e)

在降血糖肽的红外谱图中, 1669  $\text{cm}^{-1}$  处是脂肪族  $\text{C}=\text{N}$  的伸缩振动吸收峰; 1399  $\text{cm}^{-1}$  处是硫酸酯  $-\text{SO}_2$  的反对称伸缩振动吸收峰; 1156  $\text{cm}^{-1}$  处是芳香酸酯中  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  的反对称伸缩振动吸收峰; 860  $\text{cm}^{-1}$  处是硫酸酯中  $\text{C}-\text{O}$  的伸缩振动吸收峰。物理混合物的红外光谱图表现为降血糖肽和载体材料的谱图叠加, 表明物理混合物中降血糖肽和载体材料未发生任何反应。而固体分散体与物理混合物的红外谱图非常相近, 只有部分降血糖肽的特征吸收峰消失, 但并未产生新的吸收峰, 说明固体分散体中降血糖肽和载体材料未发生化学反应, 载体材料包埋降血糖肽时两者可能只是发生了氢键键合, 使降血糖肽固体分散体体系更为稳定。

通过 Peakfit 4.12 软件对酰胺 I 带的图谱进行分析, 基线矫正后, 去卷积处理, 二阶导数多次拟合使  $R^2 > 0.98$ , 确认各子峰面积的相对含量, 结果列于表 2。酰胺 I 带在 1610~1640  $\text{cm}^{-1}$  内为  $\beta$ -折叠,

1640~1650  $\text{cm}^{-1}$  内为无规卷曲, 1650~1658  $\text{cm}^{-1}$  内为  $\alpha$ -螺旋, 1660~1700  $\text{cm}^{-1}$  内为  $\beta$ -转角<sup>[15-17]</sup>。

表 2 降血糖肽和降血糖肽固体分散体在酰胺 I 带的蛋白质二级结构含量

Table 2 Protein secondary structure content of hypoglycemic peptide and solid dispersion in amide I -band protein

二级结构	酰胺 I 带波数区间/ $\text{cm}^{-1}$	降血糖肽		固体分散体	
		波数/ $\text{cm}^{-1}$	相对含量/%	波数/ $\text{cm}^{-1}$	相对含量/%
$\beta$ -折叠	1610~1640	1634	35.46	1633	25.08
无规卷曲	1640~1650	—	—	—	—
$\alpha$ -螺旋	1650~1658	—	—	—	—
$\beta$ -转角	1660~1700	1665、	64.54	1666、	74.92
		1690		1700	

注：“—”代表未测出。

由表 2 可见, 降血糖肽和固体分散体中未见  $\alpha$ -螺旋与无规则卷曲结构。降血糖肽具有 1634  $\text{cm}^{-1}$  处的  $\beta$ -折叠结构和 1665、1690  $\text{cm}^{-1}$  的  $\beta$ -转角结构; 降血糖肽固体分散体具有 1633  $\text{cm}^{-1}$  处的  $\beta$ -折叠结构和 1666、1700  $\text{cm}^{-1}$  的  $\beta$ -转角结构, 其振动位置较降血糖肽中的二级结构振动位置没有太大改变, 但是降血糖肽固体分散体中  $\beta$ -折叠结构的含量降低,  $\beta$ -转角结构含量升高, 说明在将降血糖肽制成固体分散体的过程中有序结构逐渐变为无序结构, 活性肽二级结构的构象发生变化<sup>[18]</sup>。这与课题组之前的研究相吻合<sup>[19]</sup>, 该降血糖肽以 FAGDDAPR 和 LAPPRGSL 两种肽链为主。脯氨酸和甘氨酸是影响规则二级结构形成的主要氨基酸。脯氨酸形成的肽键不具酰胺氢, 不能形成链内氢键, 多肽链中只存在脯氨酸,  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠结构即被中断。然而, 脯氨酸具有的环状结构和固定的  $\phi$  角, 在一定程度上能促使  $\beta$ -转角的形成<sup>[20]</sup>。因此, 降血糖肽及固体分散体的二级结构以  $\beta$ -转角为主, 含有少量的  $\beta$ -折叠。

### 2.5 降血糖肽固体分散体的 TEM 分析

图 4 为降血糖肽、3 种原料物理混合物和降血糖肽固体分散体的 TEM 图。

由图 4 可以看出, 降血糖肽主要表现为细密的颗粒状; 物理混合物主要有细密的颗粒状 (降血糖肽)、不规则的球状 (EL-100) 和带分叉的长条状 (HPMC) 3 种形态; 而降血糖肽固体分散体主要表现为大小相近的规则球状, 说明制备前后降血糖肽、EL-100 与 HPMC 的形貌发生了变化, 推测是降血糖肽被 EL-100 和 HPMC 形成的膜包埋导致的, 即降血糖肽分散在一个个小球状的固体分散颗粒中。并通过 Nano Measurer 软件测定分散体大小, 其直径约为(227.24±31.29) nm, 达到纳米级。

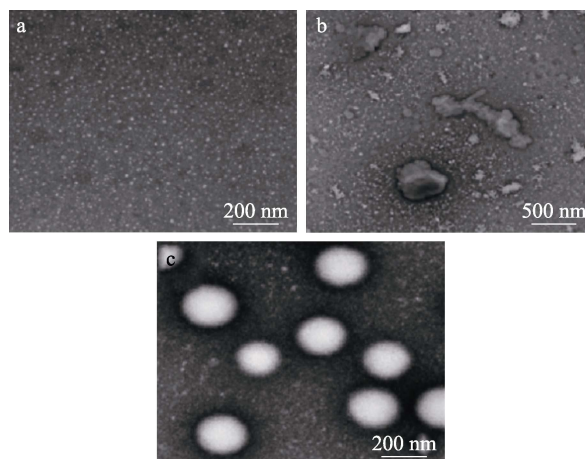


图 4 降血糖肽 (a)、3 种原料的物理混合物 (b) 及降血糖肽固体分散体 (c) 的 TEM 图

Fig. 4 TEM images of hypoglycemic peptide (a), mixture of three substances (b) and solid dispersion (c)

### 2.6 降血糖肽固体分散体的 DPP-IV 抑制率

图 5 为降血糖肽固体分散体和降血糖肽对 DPP-IV 的抑制率。可以看出, 不同质量浓度的降血糖肽固体分散体和降血糖肽对 DPP-IV 均有一定的抑制能力, 但与降血糖肽相比, 降血糖肽固体分散体对 DPP-IV 的抑制率降低了, 但仍具有较高水平。当抑制剂质量浓度低于 3 g/L 时, 固体分散体的 DPP-IV 抑制率仍高达 58.5%。这可能是由于降血糖肽在固体分散体体系中被 EL-100 包裹, EL-100 的成膜性好, 分子流动能力较差, 孵育的时间太短, 降血糖肽释放缓慢所致<sup>[12]</sup>。

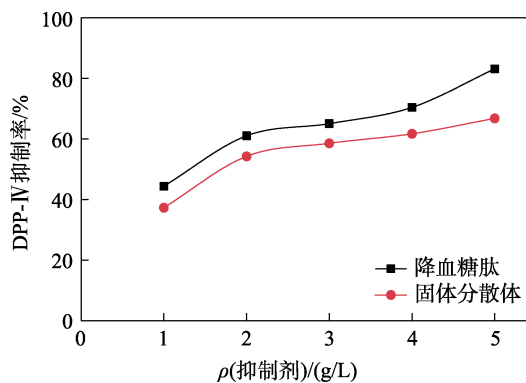


图 5 降血糖肽固体分散体和降血糖肽对 DPP-IV 的抑制率  
Fig. 5 Inhibition rate of solid dispersion and hypoglycemic peptide on DPP-IV

### 2.7 降血糖肽固体分散体的稳定性分析

#### 2.7.1 储存时间对降血糖肽固体分散体稳定性的影响

图 6 为温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60% 条件下不同储存时间降血糖肽和降血糖肽固体分散体中降血糖肽的累积释放率。可以看出, 随着储存时间的延长, 固体分散体中的降血糖肽 2 h 的累积释放率略微下降, 但仍具有较高水平, 总体来看具有较强的稳定性。

储存 5 d 后, 固体分散体中的降血糖肽的累积释放率仅下降不到 1%; 10 d 时, 累积释放率仍有 90.32%。而未制成固体分散体的降血糖肽本身 2 h 的累积释放率仅有 57.21% (0 d), 并且储存 5 d 后, 2 h 的累积释放率为 26.34%, 下降约 30%, 10 d 后 2 h 的累积释放率只剩下 18.24%, 稳定性极差。这可能是由于降血糖肽不稳定, 易受环境影响而发生不可逆的变化。综合来看, 运用固体分散技术可以显著提高降血糖肽的储存稳定性。

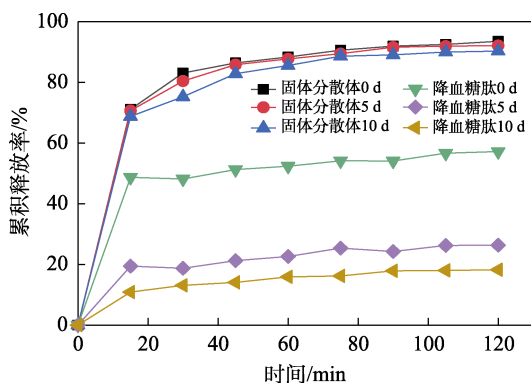


图 6 不同储存时间下降血糖肽和降血糖肽固体分散体中降血糖肽的累积释放率

Fig. 6 Cumulative release of hypoglycemic peptide and it in solid dispersion at different storage times

### 2.7.2 储存温度对降血糖肽固体分散体稳定性的影响

图 7 为不同储存温度下降血糖肽固体分散体中降血糖肽的累积释放率。

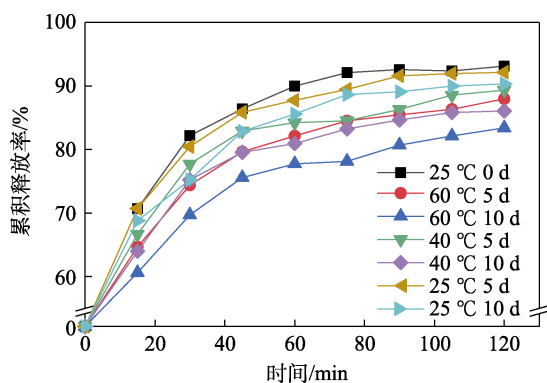


图 7 不同储存温度下降血糖肽固体分散体中降血糖肽的累积释放率

Fig. 7 Cumulative release of hypoglycemic peptide in solid dispersion at different storage temperatures

可以看出, 在不同储存温度下, 随着储存时间的延长, 固体分散体中的降血糖肽 2 h 的累积释放率均有一定的下降, 但仍具有较高水平, 总体来看具有较强的稳定性。60 °C 下, 储存 5 d 后, 固体分散体中的降血糖肽的累积释放率比 0 d 下降约 5%, 10 d 时, 累积释放率降至 83.41%。40 °C 下, 储存

10 d 后累积释放率仍有 86.07%。25 °C 下, 储存 10 d 后累积释放率仍高达 90.32%, 均具有较高水平。但温度对降血糖肽仍具有一定影响, 高温会加速固体分散体中降血糖肽的变性与降解, 储存时需控制温度。

初步了解了温度对固体分散体稳定性的影响, 为后续降血糖肽固体分散体的功能性食品和药品开发提供了初步实验基础, 但固体分散体的有效期仍需通过加速实验和长期实验来提供参考依据; 储存条件对固体分散体稳定性的影响, 不同的制备方式、制备条件对其性质的改善缺乏对比研究等, 仍需进一步探索<sup>[21-22]</sup>。

## 3 结论

以 EL-100 为肠溶载体, HPMC 为调节剂, 可以有效地提高降血糖肽的累积释放率, 在  $m(\text{降血糖肽}) : m(\text{EL-100}) : m(\text{HPMC}) = 1 : 2 : 0.2$  条件下制备的降血糖肽固体分散体, 载药率达到 90.14%, 2 h 的累积释放率达到 93.54%。同时, 经过固体分散技术处理后, 降血糖肽的 DPP-IV 抑制率仍具有较高水平, 并且提高了降血糖肽的储存时间, 有较好的应用前景。

## 参考文献:

- [1] SANCHEZ A, VAZQUEZ A. Bioactive peptides: A review[J]. Food Quality and Safety, 2017, 1(1): 29-46.
- [2] BHULLAR K S, DREWS S J, WU J P. Translating bioactive peptides for COVID-19 therapy[J]. European Journal of Pharmacology, 2021, 890(5): 173661.
- [3] WANG N (王宁), LINGHU E Q (令狐恩强). Research progress of oligopeptide absorption[J]. Chinese Journal of Gastrointestinal Endoscopy (中华胃肠内镜电子杂志), 2018, 5(4): 167-173.
- [4] NONGONIERMA A B, FITEGERALD R J. Features of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from dietary proteins[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(1): 1-11.
- [5] POWERB G O, BRUEN C, BRENNAN L, et al. In vitro bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed whey protein: Targeting the enteroinsular axis[J]. Food & Function, 2015, 6(3): 972-980.
- [6] UENISHI H, KABUKI T, SETO Y, et al. Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats[J]. International Dairy Journal, 2012, 22(1): 24-30.
- [7] HAO X L (郝晓丽), JI R M T (吉日木图), HE J (何静). Recent insights in the use of nanocarriers for the oral delivery of bioactive peptides[J]. Food Science (食品科学), 2021, 42(11): 341-348.
- [8] CHRISTOPHERSEN P C, BIRCH D, SAARINEN J, et al. Investigation of protein distribution in solid lipid particles and its impact on protein release using coherent anti-stokes Raman scattering microscopy[J]. Journal of Controlled Release, 2015, 197: 111-120.
- [9] KARAMANIDOU T, KARIDI K, BOURGANIS V, et al. Effective incorporation of insulin in mucus permeating self-nanoemulsifying drug delivery systems[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 97: 223-229.
- [10] LU W (鲁伟), REN G P (任国谱), SONG J M (宋俊梅). Determination method of polypeptide content in protein hydrolysate [J]. Food Science (食品科学), 2005, 26(7): 169-171.
- [11] LI K (李珂). Study on the pharmacokinetics of APIC in animals and

- preparation of APIC solid dispersion enteric-coated capsules[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology (华中科技大学), 2008.
- [12] LI Y (李扬), LI J (李金), TAO T (陶涛). Applications of eudragit to oral solid preparations[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals (中国医药工业杂志), 2016, 47(5): 629-636.
- [13] DENG J (邓姣), LIU X (刘鑫), CHENG W H (成文豪), *et al.* Preparation and antioxidant activity of pH responsive microcapsules loaded with resveratrol[J]. Food Science (食品科学), 2019, 40(20): 54-59.
- [14] National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the people's Republic of China[S]. Four parts. Beijing: China Medical Science and Technology Press (中国医药科技出版社), 2020: 121.
- [15] HASNI I, BOURASSA P, HAMDANI S, *et al.* Interaction of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins with tea polyphenols[J]. Food Chemistry, 2011, 126(2): 630-639.
- [16] LIU W E (刘雯恩), ZHOU Y F (周艳芳), FAN Z Q (范志强), *et al.* Optimization of purification process of collagen type I [J]. Fine Chemicals (精细化工), 2019, 36(5): 850-855, 874.
- [17] JIANG Z (姜哲), YUAN J G (袁久刚), WANG P (王平), *et al.* Extraction of wool keratin by urea-choline chloride deep eutectic solvent[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2019, 36(2): 257-261.
- [18] CZESLIK C, WITTEMANN A. Adsorption mechanism, secondary structure and local distribution of proteins at polyelectrolyte brushes [J]. Colloid & Polymer Science, 2020, 298(7): 775-789.
- [19] LANG M, SONG Y S, LI Y, *et al.* Purification, identification, and molecular mechanism of DPP-IV inhibitory peptides from defatted antarctic krill powder[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(2): 1-8.
- [20] FENNEMA O R. Food chemistry[M]. Beijing: China Light Industry Press (中国轻工业出版社), 2003.
- [21] DU Q (杜谦), LI X Y (李兴业), CUI B (崔博), *et al.* Effect of carrier on performances of emamectin benzoate solid nanoformulations[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(2): 352-357, 425.
- [22] FU T T (付亭亭), ZUO W B (左文宝), GUO Y S (郭珏铄), *et al.* Research advances in dissolution mechanism and physical stability of solid dispersions[J]. Chinese Journal of New Drugs (中国新药杂志), 2020, 29(3): 275-280.

(上接第 941 页)

- [17] ZHANG T K, WANG Q, LI G Q, *et al.* Formation of carbon nanotubes from potassium catalyzed pyrolysis of bituminous coal[J]. Fuel, 2019, 239: 230-238.
- [18] TANG C J, ZHANG H L, DONG L. Ceria-based catalysts for low-temperature selective catalytic reduction of NO with NH<sub>3</sub>[J]. Catalysis Science & Technology, 2016, 6(5): 1248-1264.
- [19] SMITH M W, DALLMEYER I, JOHNSON T J, *et al.* Structural analysis of char by Raman spectroscopy: Improving band assignments through computational calculations from first principles[J]. Carbon, 2016, 100: 678-692.
- [20] KHUSNUN N F, JALIL A A, TRIWAHYONO S, *et al.* Directing the amount of CNTs in CuO-CNT catalysts for enhanced adsorption-oriented visible-light-responsive photodegradation of *p*-chloroaniline[J]. Powder Technology, 2018, 327: 170-178.
- [21] LIU H, FAN Z X, SUN C Z, *et al.* Improved activity and significant SO<sub>2</sub> tolerance of samarium modified CeO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> catalyst for NO selective catalytic reduction with NH<sub>3</sub>[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2019, 244: 671-683.
- [22] ZHAO Y Y, CHOI B, KIM D. Effects of Ce and Nb additives on the de-NO<sub>x</sub> performance of SCR/CDPF system based on Cu-beta zeolite for diesel vehicles[J]. Chemical Engineering Science, 2017, 164: 258-269.
- [23] SHANGGUAN J, LI C H, MIAO M Q, *et al.* Surface characterization and SO<sub>2</sub> removal activity of activated semi-coke with heat treatment[J]. New Carbon Materials, 2008, 23(1): 37-43.
- [24] WANG J P, YAN Z, LIU L L, *et al.* *In situ* DRIFTS investigation on the SCR of NO with NH<sub>3</sub> over V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> catalyst supported by activated semi-coke[J]. Applied Surface Science, 2014, 313: 660-669.
- [25] ZHU J, GAO F, DONG L H, *et al.* Studies on surface structure of M<sub>x</sub>O<sub>y</sub>/MoO<sub>3</sub>/CeO<sub>2</sub> system (M=Ni, Cu, Fe) and its influence on SCR of NO by NH<sub>3</sub>[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2010, 95(1): 144-152.
- [26] WANG Q L, HUANG X N, FENG Y H, *et al.* Interaction mechanism study on simultaneous removal of 1, 2-dichlorobenzene and NO over MnO<sub>x</sub>-CeO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> catalysts at low temperatures[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2021, 60(13): 4820-4830.
- [27] LIU Z M, LIU Y X, CHEN B H, *et al.* Novel Fe-Ce-Ti catalyst with remarkable performance for the selective catalytic reduction of NO<sub>x</sub> by NH<sub>3</sub>[J]. Catalysis Science & Technology, 2016, 6(17): 6688-6696.
- [28] FAN J W, NIU X F, TENG W, *et al.* Highly dispersed Fe-Ce mixed oxide catalysts confined in mesochannels toward low-temperature oxidation of formaldehyde[J]. Journal of Materials Chemistry A, 2020, 8(33): 17174-17184.
- [29] LIU K, HE H, YU Y B, *et al.* Quantitative study of the NH<sub>3</sub>-SCR pathway and the active site distribution over CeWO<sub>4</sub> at low temperatures[J]. Journal of Catalysis, 2019, 369: 372-381.
- [30] HUANG X, LIU Z, WANG D, *et al.* The effect of additives and intermediates on vanadia-based catalyst for multi-pollutant control[J]. Catalysis Science & Technology, 2020, 10(2): 323-326.

(上接第 949 页)

- [12] RAJA S, POOJA Y, URVASHI V T. Novel dioxolan derivatives of indole as HIV-1 integrase strand transfer inhibitors active against RAL resistant mutant virus[J]. ChemistrySelect, 2016, 1: 5471-5478.
- [13] LI L, LI Z, WANG K L, *et al.* Design, synthesis, and biological activities of aromatic gossypol Schiff base derivatives[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(46): 11080-11088.
- [14] FREI A, KING A P, LOWE G J, *et al.* Nontoxic cobalt(III) Schiff base complexes with broad-spectrum antifungal activity[J]. Chemistry, 2021, 27(6): 2021-2029.
- [15] SUN Y, LU Y L, BIAN M L, *et al.* Pt(II) and Au(III) complexes containing Schiff-base ligands: A promising source for antitumor treatment[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 211: 113098.
- [16] STOLARCZYK M, WOLSKA A, MIKOLAJCZYK A, *et al.* A new pyrimidine schiff base with selective activities against enterococcus faecalis and gastric adenocarcinoma[J]. Molecules, 2021, 26(8): 2296.
- [17] CHEN S L (陈善龙), TAN J (谭娟). Synthesis of histone deacetylases inhibitors and their antitumor activities *in vitro*[J]. Drugs & Clinic (现代药物与临床), 2017, 32(6): 967-974.
- [18] HU Y Y, PAN G X, YANG Z X, *et al.* Novel Schiff base-bridged multi-component sulfonamide imidazole hybrids as potentially highly selective DNA-targeting membrane active repressors against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Bioorganic Chemistry, 2021, 107: 104575.
- [19] KANG D W, RUIZ F X, SUN Y Y, *et al.* 2,4,5-Trisubstituted pyrimidines as potent HIV-1 NNRTIs: Rational design, synthesis, activity evaluation, and crystallographic studies[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 64(7): 4239-4256.
- [20] JENNIFER A D, KATHRYN M D, GOVERT J D, *et al.* Designing, synthesis and characterization of 2-aminothiazole-4-carboxylate Schiff bases; Antimicrobial evaluation against multidrug resistant strains and molecular docking[J]. BMC Chemistry, 2019, 13(1): 115.
- [21] WAN Z Y (万正勇), CHEN F E (陈芬儿), CLERCQ E D, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of S-DAPY derivatives as novel HIV-1 inhibitors[J]. Scientia Sinica Chimica (中国科学: 化学), 2015, 45(9): 961-967.